

Microscopia: muito mais que uma grande lupa

Karla Balzuweit

Departamento de Física – Instituto de Ciências Exatas e Centro de Microscopia da UFMG
Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos 6627 – Belo Horizonte – CEP 31270-901 – Minas Gerais
email:karlaweit@gmail.com; karla@fisica.ufmg.br

O presente texto é um resumo extremamente sucinto a respeito de uma técnica de observação e caracterização de materiais de forma ampla, cuja abrangência e importância tem aumentado de forma vertiginosa na última década: a Microscopia. Inúmeros livros e artigos científicos em áreas tão diversas como a Arqueologia, Belas Artes, Biologia, Engenharias, Farmácia, Física, Geologia, Medicina e Química, onde a técnica é utilizada para explicar fenômenos e teorias, caracterizar materiais, fabricar dispositivos, e também no desenvolvimento dos próprios microscópios evidenciam este avanço e confirmam a microscopia como uma técnica totalmente inter e multidisciplinar.

1 – Porque Microscopia?

A observação de objetos e materiais utilizando instrumentos mais poderosos que nosso olhos remonta à própria invenção das lentes e lupas. Ao longo de vários séculos, diversos instrumentos de medida foram sendo desenvolvidos, e instrumentos como o telescópio e o microscópio, se tornaram fundamentais, respectivamente na pesquisa de corpos celestes (Astronomia) e pequenos organismos (Biologia).

O telescópio foi essencial no desenvolvimento da Astronomia e Astrofísica como conhecemos hoje; a partir Galileu e Newton [1,2]. O microscópio óptico foi fundamental no desenvolvimento da Biologia, com a visualização de pequenos microorganismos, bactérias e células, a partir de van Leewenhoek e Robert Hooke, gerando uma verdadeira revolução nas ciências da vida no final da Idade Média – início da Renascença [3].

Durante décadas, e até hoje, a primeira idéia que surge quando se pensa em um microscópio é a magnificação ou aumento de objetos. Entretanto, no final do século XIX e início do século XX, as descobertas que levaram à Mecânica Quântica foram essenciais no desenvolvimento de inúmeros novos instrumentos, técnicas e materiais.

Às lupas e microscópios ópticos convencionais foram acrescentados os microscópios eletrônicos de transmissão, microscópios eletrônicos de varredura [4-8], microscópios de feixe de íons, microscópios de nêutrons, microscópios de raios-x, microscópios ópticos confocais [9,10], de campo próximo [11], de fluorescência, e os microscópios de varredura por sonda: microscópios de tunelamento [12, 13], microscópios de força atômica [14] e suas variantes, ampliando consideravelmente nosso universo observável, na direção da escala atômica.

2 – Muito além de uma grande lupa.

Pode-se dizer que a microscopia eletrônica, de íons, nêutrons e raios-x se tornou possível quando De Broglie, em 1925, postulou a dualidade onda-partícula [15,16]. Desta forma, tanto fótons de diversos comprimentos de onda, incluindo a luz visível, quanto partículas como elétrons, íons e nêutrons, apresentam natureza ondulatória, ou de partícula, podendo ser tratados ora de uma forma ora de outra. Assim, as teorias ondulatórias desenvolvidas na óptica originalmente para luz visível por Huygens, Abbe, Rayleigh [17-19], e a abordagem de partícula ou espectroscopia, usada no estudo de colisões entre partículas por Bethe e outros [7, 20] se tornam fundamentais para entender e interpretar corretamente todas as informações obtidas em um microscópio, mas também no funcionamento e na construção dos mesmos.

Paralelamente ao desenvolvimento do microscópio eletrônico de transmissão (MET ou TEM) por Ruska e Knoll em 1932, o conceito do microscópio eletrônico de varredura (MEV ou SEM) foi apresentado por Knoll em 1935. Von Ardenne em 1938, construiu um microscópio eletrônico de varredura de transmissão, adicionando eletroímãs para fazer a varredura do feixe de elétrons. O primeiro MEV a funcionar com espécimes de espessura considerável, assim como ocorre hoje em dia, foi descrito por Zworykin *et al.* em 1942 na RCA [7].

A produção industrial de microscópios eletrônicos de transmissão iniciou-se 4 anos após a publicação de Knoll e Ruska, com empresas como Siemens e Halske, Hitachi, Philips, Jeol e RCA, principalmente após o término da 2a. Guerra Mundial.

Mais recentemente, na década de 1980 a 1990 foram inventados diversos microscópios de varredura por sonda: a Microscopia de Varredura de Tunelamento (STM) e as Microscopias de Força Atômica (AFM), incluindo uma enorme gama de variações que possibilitam inclusive caracterização de propriedades magnéticas.

É possível agrupar os microscópios de diversas formas, mas uma delas agrupa os microscópios ópticos, eletrônicos, de íons, de nêutrons de raio-x, onde há uma fonte de radiação (fótons, elétrons, íons e nêutrons), um sistema de aberturas e lentes (vidro, elétricas, magnéticas e eletromagnéticas) e um sistema de detecção, onde diversos tipos de detectores são utilizados, como cameras CCD, CMOS, detectores de elétrons e fótons. Analisa-se o resultado da interação da radiação com a amostra, tornando-se possível obter diretamente informação da morfologia, elementos químicos e estrutura cristalina que compõem a amostra.

Do outro lado estão os microscópios de varredura por sonda, onde há uma ponta de prova controlada por uma eletrônica que varre a ponta sobre a amostra e as informações são o resultado da interação da ponta com a amostra, que podem ser a força atômica, tunelamento, força elétrica ou magnética, e outras variantes. Estas técnicas de microscopia são complementares à microscopia eletrônica e de íons, com resolução atômica nas medidas de diferença de altura das amostras, enquanto a microscopia eletrônica tem resolução atômica, lateralmente.

O conceito de resolução: a capacidade de distinguir dois pontos ou características distintas da amostra sobrepõem-se ao de magnificação, que atualmente é fácil entender usando as imagens digitais. Uma imagem de mesma magnificação mas resolução baixa em pixels mostra menos informação que a mesma imagem na mesma magnificação mas resolução maior em pixels.

A grande vantagem da Microscopia é que se trata de uma técnica que atualmente, além de funcionar como um instrumento de aumento, alguns equipamentos permitem aumentos menores que 1 \AA [21,22], também é possível obter outras informações a respeito

da amostra de forma quase simultânea, dependendo do equipamento. Informações a respeito de elementos químicos, composição química, valência, cristalografia, estrutura cristalográfica, condutividade, características das bandas de energia, etc. são alguns dos exemplos mais comuns das características possíveis de se obter em um microscópio. Nos últimos anos tem-se observado um aumento significativo de experimentos in-situ em microscópios como testes mecânicos de tensão e tração, medidas elétricas, transições de fase em alta e baixa temperatura e reações químicas com resolução espacial da ordem de nm a subangstrom, e temporal de até femtosegundos, como nos experimentos de Ahmed Zewail, prêmio nobel de química de 1999 [23] e também experimentos in-vivo em amostras biológicas [24, 25].

Na última década, observou-se o desenvolvimento de microscópios ópticos com resolução atômica, através da fluorescência, utilizando marcadores que luminescem com a incidência de determinados comprimentos de onda, permitindo a observação de amostras biológicas com resolução nanométrica [26].

A possibilidade da observação tridimensional ou multiespectral das amostras, onde cada pixel na imagem representa uma informação adicional (espectro químico, padrão de difração [28], etc) juntamente com análises in-situ nas mais diversas áreas tem contribuído para ampliar ainda mais o entendimento sobre a matéria e os organismos vivos. A observação e caracterização, em relação a tamanho, forma, organização cristalina e química, com possibilidade de identificação de átomos individuais em materiais nanométricos heterogêneos abrem possibilidades na criação de novos dispositivos e sensores de tamanho cada vez mais reduzido, representado pela nanociência e nanotecnologia. A identificação da forma e da localização dos átomos em macromoléculas, vírus, enzimas, proteínas são fundamentais no entendimento do funcionamento de todos organismos vivos e conseqüentemente no desenvolvimento de medicamentos para os diversos tipos de doenças levando mais uma vez ao trabalho multi e interdisciplinar entre as áreas exatas, da terra e engenharias e as ciências da vida.

É importante frisar que o entendimento da interação do feixe de radiação: luz, elétrons, íons, nêutrons ou raios-X, com a amostra ou da ponta de prova com a amostra. bem como o funcionamento dos equipamentos e dos detectores é fundamental na

interpretação correta das imagens de dados, principalmente quando se trabalha no limite das características dos microscópios.. A partir destas considerações torna-se possível entender o funcionamento dos microscópios, suas vantagens e limitações. E desta forma obter as informações que se deseja ou descobrir fenômenos ou materiais ou processos novos.

3 - Bibliografia

- [1] "A Short History of Science to the Nineteenth Century", Charles Singer, Claredon Press (1941).
- [2] "The Sleepwalkers: A History of Man's Changing Vision of the Universe". Arthur Koestler, Penguin books (1990).
- [3] "The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society". Gest, H. Notes and Records of the Royal Society of London 58 (2): 187–201. [doi: 10.1098/rsnr.2004.0055](https://doi.org/10.1098/rsnr.2004.0055) (2004).
- [4] Knoll, M. and Ruska, E. (1932) *Z. Physik* 78, 318.
- [5] Ernst Ruska – Biographical, homepage oficial prêmio Nobel www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/ruska-bio.html, acessado em 10/10/2016.
- [6] Transmission Electron microscopy: a textbook for materials science; D.B. Williams and C.B.Carter; Plenum Pub. (1996).
- [7] Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis; J.I. Goldstein, D.E. Newbury, P. Echlin, D.C. Joy, A.D. Romig Jr., C. E. Lyman, C. Fiori and E. Lifshin, Plenum Press 2nd edition (1992).
- [8] [//nau.edu/CEFNS/Labs/Electron-Microprobe/Class-Notes/](http://nau.edu/CEFNS/Labs/Electron-Microprobe/Class-Notes/) acessado em 12/10/2016.
- [9] "Memoir on inventing the confocal scanning microscope". *Scanning*. **10** (4): 128–138. [doi: 10.1002/sca.4950100403](https://doi.org/10.1002/sca.4950100403) (1988).
- [10] Handbook of Biological Confocal Microscopy (3rd ed.). Pawley JB (editor) Berlin: Springer. [ISBN 0-387-25921-X](https://doi.org/10.1007/978-0-387-25921-X) (2006).
- [11] "Super-resolution Aperture Scanning Microscope". Ash, E.A. & Nicholls, G. *Nature*. **237** (5357): 510–2 (1972).

- [12] "Scanning tunneling microscopy". Binnig, G.; Rohrer, H.. IBM Journal of Research and Development. **30** (4): 355–69 (1986).
- [13] www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/press.html, acessado em 10/10/2016.
- [14] "Atomic-Force Microscope", Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Physical Review Letters. **56**: 930–933 (1986).
- [15] "The de Broglie pilot wave theory and the further development and new insights arising out of it", David Bohm, Basil Hiley Foundations of Physics, volume 12, number 10 (1982).
- [16] "The Feynman Lectures on Physics", Feynman R, Leighton R, and Sands M., 3 volumes. Addison Wesley (1964, 1966); [//www.feynmanlectures.caltech.edu/](http://www.feynmanlectures.caltech.edu/), acessado em 12/10/2016.
- [17] "Optics", Hecht (1997), Addison Wesley Publishing Company (1997).
- [18] "Modern Optics", R. Guenther, John Wiley and Sons (1990).
- [19] The basics of crystallography and diffraction, C. Hammond, Oxford Science Publications (2001).
- [20] "Zur Theorie der Metalle. I. Eigenwerte und Eigenfunktionen der linearen Atomkette". H. Bethe, Zeitschrift für Physik, **71**:205–226 (1931).
- [21] Sub-ångstrom resolution using aberration corrected electron optics, P. E. Batson, N. Dellby, O. L. Krivanek, Nature 418, 617-620 (8 August 2002).
- [22] Sub-ångström-resolution crystallography reveals physical distortions that enhance reactivity of a covalent enzymatic intermediate, Stefan Lüdtke, Piotr Neumann, Karl M. Erixon, Finian Leeper, Ronald Kluger, Ralf Ficner, Kai Tittmann, Nature Chemistry 5, 762–767 (2013).
- [23] www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1999/, acessado em 10/10/2016.
- [24] www.civm.duhs.duke.edu/, acessado em 10/10/2016.
- [25] Clark et al. Proc. SPIE 8668-175, 2013.
- [26] [//www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/), acessado em 13/10/2016.
- [27] "Three dimensional atomic imaging of crystalline nanoparticles." Van Aert S, Batenburg KJ, Rossell MD, Erni R, van Tendeloo G, Nature 470 - 374–377 (2011).
- [28] <http://www.dierk-raabe.com/ebsd-and-3d-ebsd/>, acessado em 13/10/2016.